

ARTÍCULO TÉCNICO

Diana Rocío Vásquez¹ y
Olga Lucía Mayorga²

ABSTRACT

Title: Using Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) for exact and fast tryptophane determination in native Colombian corns

A calibration equation was developed in this study by Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) to predict amino acid tryptophan content in Colombian maize. HPLC and UV detection was used at 280 nm for direct quantification of tryptophan concentration in maize grain. Sixty Colombian maize accessions were scanned by NIRS. Forty spectra were used for calibration and twenty for validation. A prediction equation was produced having 0.001 standard calibration error (SCE) and 0.979 coefficient of correlation (RSQ). Tryptophan concentration data from the maize accessions obtained by the direct method (HPLC) used for the calibration set ranged from 0.033% to 0.083% and 0.044% to 0.062% in the validation samples. The RSQ_{val} (fraction of explained variance for independent validation samples or square of correlation coefficient r) obtained was low, due to the limited variability and number of samples. However, according to the Ji-square test, NIRS prediction values were adjusted to the values obtained by HPLC with 95% confidence level.

Key words: aminoacid, tryptophan, Colombian maize, Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS), calibration equation, NIRS validation.

Recibido: enero 12 de 2005.
Aceptado: mayo 2 de 2005.

1. Licenciada en Química. Programa de Fisiología y Nutrición Animal. Joven Investigadora de COLCIENCIAS. CORPOICA. e-mail: dinanavas@yahoo.es
2. Química, MSc. Bioquímica. Programa de Fisiología y Nutrición Animal. C.I. Tibaitatá, CORPOICA. e-mail: lmayorga@corpoica.org.co

Uso de la Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (nirs) para la cuantificación rápida y precisa de triptófano en maíces colombianos

RESUMEN

En este estudio se desarrolló una ecuación de calibración mediante Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (*Near Infrared Reflectance Spectroscopy*, NIRS) para predecir el contenido del aminoácido triptófano en maíces colombianos. El método de cuantificación directa de la concentración de triptófano en el grano de maíz fue por HPLC y la detección UV a 280 nm. Se escanearon 60 matrices de maíz colombiano mediante NIRS, de las cuales 40 espectros se destinaron para calibración y 20 para validación, generándose una ecuación de predicción con un Error Estándar de Calibración (SEC) de 0,001 y un Coeficiente de Correlación (RSQ) de 0,979. Los datos de concentración de triptófano en las matrices de maíz obtenidos por el método directo (HPLC) usados para la calibración se encontraron en el rango de 0,033 a 0,083% y las muestras de validación en el rango de 0,044 a 0,062%. El RSQ_{val} (fracción de la varianza explicada de muestras independientes de validación o coeficiente de correlación al r cuadrado) obtenido, fue bajo debido a la poca variabilidad de las muestras y al número de muestras. Sin embargo, de acuerdo con la prueba del Ji-cuadrado, los valores de predicción por NIRS se ajustaron a los valores obtenidos por HPLC con un nivel de confianza del 95%.

Palabras clave: Aminoácidos, triptófano, maíces colombianos, espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS), ecuación de predicción, validación.

INTRODUCCIÓN

LA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA DE reflectancia en el infrarrojo cercano (NIR) es usada en la actualidad como análisis de rutina para evaluar la calidad de algunas semillas (Delwiche *et al.*, 1995, 1996; Shu *et al.*, 1999 a,b). La principal ventaja de la técnica NIRS es su bajo costo por muestra, ya que no requiere reactivos químicos ni material de vidrio. Así mismo, es una técnica no destructiva lo que la hace ideal para trabajar en muestras que se deben conservar y contribuye a la conservación del medio ambiente al no producir residuos contaminantes. Además, permite la estimación simultánea de varios análisis en una sola medida, con alta repetibilidad, reproducibilidad y velocidad de respuesta; así, NIRS garantiza la agilidad en la toma de decisiones. Es capaz de producir información analítica sobre los constituyentes de declaración obligatoria (ej: humedad, proteína, grasa, etc.) y no obligatoria, pero de interés nutricional (ej: factores antinutritivos, aminoácidos, valor energético, etc.) (Garrido *et al.*, 1996). Algunos investigadores lograron estimar por NIRS los aminoácidos esenciales tales como lisina, treonina y

metionina en alimentos (Van Kempen y Bodin, 1998). A su vez, Wu *et al.* (2002) realizaron un perfil de aminoácidos en una matriz de arroz logrando la calibración de 17 aminoácidos sin incluir triptófano. Fontaine *et al.* (2002) obtuvieron ecuaciones de predicción de metionina, cisteína, metionina + cisteína, lisina, treonina, triptófano, arginina, isoleucina, leucina y valina en cereales como el trigo, la cebada, el maíz, el triticale, el salvado de trigo, el arroz y el sorgo.

A nivel nacional, dentro del Plan de Innovación y Desarrollo Tecnológico del Cultivo de Maíz que desarrolla CORPOICA, se inició un proyecto tendiente a mejorar la calidad del maíz colombiano para usos industriales y alimenticios; se busca aumentar los niveles de aminoácidos esenciales, tipos de almidón y calidad de aceite. Para esto se requiere el desarrollo de técnicas confiables y eficientes en laboratorio y campo, para diferenciar entre plantas que tienen o no la característica genotípica de interés. Las ventajas de la técnica de NIRS hacen a esta técnica ideal para el proceso de mejoramiento y selección de materiales agrícolas y de producción pecuaria. En consecuencia,

el objetivo de este trabajo fue estudiar el potencial del NIRS para estimar el contenido de triptófano en muestras de maíces colombianos provenientes del Banco de Germoplasma del United States National Plant Germoplasm System y desarrollar una ecuación de predicción para NIRS usando las concentraciones de triptófano encontradas mediante HPLC y detección UV a 280 nm, lo cual permitirá identificar en forma rápida y precisa los genotipos de maíz de alta calidad de acuerdo al contenido de triptófano, a fin de desarrollar procesos de mejoramiento en parentales y en líneas segregantes de maíz.

Materiales y métodos

Origen de las muestras. Se usaron granos de sesenta accesiones de germoplasma de Maíz Colombiano que se encuentran formando parte del United States National Plant Germoplasm System en el NCRPIS (North Central Regional Plant Introduction Station), Iowa State University, Ames, USDA, ARS. La muestra evaluada representa cerca del 3,0 % de todos las razas contenidas en el Sistema Nacional de Bancos de Germoplasma de CORPOICA -C.I. Tibaitatá- y forman parte de la colección colombiana de maíz con 2.200 accesiones. Cada accesión posee identificación alfanumérica compuesta por una sigla de tres letras y un número de tres cifras; las letras identifican el origen geográfico y el número es un consecutivo.

Tratamiento de la muestra. Las muestras de maíz fueron procesadas en un molino marca Thomson® usando malla #40 y continuando con el proceso de desengrase (Metodología AOAC 920.39, 1995) mediante el equipo Goldfish®.

Hidrólisis alcalina. El contenido de triptófano en las accesiones de maíz se determinó mediante la metodología de la AACC 07-25 (1984). A 0,04 g de muestra se le adicionó 1 ml de NaOH 4,2 N y 20 µl de n-octanol colocando inmediatamente en un baño de hielo, eliminando el oxígeno mediante bomba de vacío y reemplazándolo por nitrógeno (este ciclo se corrió tres veces durante 3 min) para dejarlo en atmósfera de nitrógeno. El tubo fue tapado herméticamente y colocado en estufa a 105 °C por 24 horas. Se adicionaron 400 µl de buffer de citrato de sodio pH 4,25, 0,5 N y 350 µl de HCl concentrado; la mezcla resultante se agitó y se enfrió a temperatura ambiente. Despuésm, el pH de la muestra fue

llevado a valores entre 4 y 5 con HCl 6N ó NaOH 2N. Posteriormente, se transfirió el hidrolizado a un balón aforado de 5 ml completado su volumen con buffer citrato pH 4,25, 0,5 N. La muestra fue entonces filtrada a través de papel Whatman No. 1 y centrifugada a 14.000 rpm por 10 min, tomando una alícuota que fue filtrada nuevamente a través de membranas de 0,45 µm, quedando así lista para la determinación por HPLC.

Determinación del contenido de triptófano por HPLC. El análisis cromatográfico fue realizado en un cromatógrafo Shimadzu LC-6A®, equipado con horno para columna Shimadzu CTO-6A®, Sistema controlador Shimadzu SCL-6B®, Bomba Shimadzu LC-6A®, autoinyector Shimadzu SIL-6B® y detector Shimadzu SPD-6 AV UV-Vis®. La columna usada fue una RP-18 ref. Shim Pack CLC ODS 0,15 m x 6 mm; el sistema de elución fue isocrático con fase móvil Metanol : Acetato de sodio 8,5 mM, pH 4 (5:95) y detección UV a 280 nm. A 0,5 ml/min y temperatura de 45°C. El tiempo de corrida fue 42 min con un tiempo de retención de 36,16 min. El volumen de inyección fue de 50 µl de muestra.

Lectura por NIRS. Se usó un instrumento Foss NIRSystems Modelo 6500®, con un módulo transportador y detector de reflectancia. El procesamiento de los espectros y la calibración se realizaron mediante el software WinISI II® v 1.02 a.

Las accesiones de maíz que fueron analizadas por el método directo de HPLC se escanearon por NIRS en el rango visible 400 – 1.098 nm y en el infrarrojo cercano 1.100 – 2.498 nm cada 2 nm, utilizando una microcubeta de 1,5 g (Ref. TKIH-0348) y un portacubeta circular (Ref. TKIH-0317). Cada muestra fue escaneada 16 veces, obteniéndose un valor de reflectancia de cada longitud de onda expresada como log (1 / R) usando una cerámica interna como referencia (Fontaine *et al.*, 2001).

Ecuación de predicción por NIRS. Se creó un archivo de calibración *.CAL para las cuarenta muestras seleccionadas al azar para calibración, donde se ingresaron los valores del contenido de triptófano cuantificados por el método HPLC. Los espectros fueron tratados matemáticamente mediante la corrección por los procedimientos de dispersión SNV (variación estándar normal) y *detrend* a fin de reducir los efectos del

tamaño de partícula y del empaquetamiento de la muestra. Se trabajó con primera, segunda y tercera derivada, de los espectros de calibración con una *gap* o brecha de dos, cuatro, seis y ocho nm y suavizado o *Smooth* de uno hasta ocho nm (Fontaine, *et al.*, 2002, 2004). La técnica de regresión usada fue una modificación de la Regresión Parcial de Mínimos Cuadrados (MPLS) mediante una validación cruzada en donde se eliminaron muestras con valores de H (espectros fuera del rango) mayores de 4 y valores de T mayores a 2,5 (muestras que no se encuentran dentro del modelo de calibración) (Wu, J. *et al.*, 2002).

Validación por NIRS. La validación fue realizada mediante la utilización de una de las herramientas del software WinISI®, *Monitor Results* en donde se compararon los valores predichos por la ecuación de calibración y los valores obtenidos de la cuantificación por HPLC de las muestras utilizadas para validación. Finalmente se utilizó la prueba de hipótesis del Ji-Cuadrado para confirmar si los valores observados experimentalmente (O) estarán de acuerdo con los valores esperados (E) y así aceptar o rechazar la ecuación hallada. La fórmula general para X^2 es:

$$X^2 = \sum (O - E)^2 / E$$

H_0 : O = E; hay concordancia
 H_A : O ≠ E; no hay concordancia

Se rechaza H_0 si: $X^2 > X^2 \alpha$ (GL);

Se acepta H_0 si: $X^2 < X^2 \alpha$ (GL);

En donde,

Grados de libertad (GL) = n - 1

$X^2 = J_i$ -calculado

$X^2 \alpha$ (GL) = J_i -tabulado

Resultados y discusión

Análisis de triptófano por HPLC. La determinación del contenido de triptófano por el método de HPLC previamente validado para este estudio (Mayorga y Vásquez, 2004) mediante el método de cuantificación de estándar externo, presentó una linealidad del 99% y una recuperación del 90,8%, por lo cual los datos de HPLC fueron corregidos por este factor de recuperación. Las muestras utilizadas para calibración y validación del método de NIRS incluyen muestras con niveles bajos, medios y altos en contenido de triptófano, medidas por HPLC; estos datos se encuentran referenciados en la Tabla 1 y corresponden al contenido promedio de cuatro réplicas de cada muestra.

Tabla 1. Contenido de triptófano por HPLC en muestras de maíz colombiano provenientes del NCRPIS*.

MUESTRAS PARA CALIBRACIÓN								MUESTRAS PARA VALIDACIÓN			
ID	Trip (%)**	ID	Trip (%)**	ID	Trip (%)**	ID	Trip (%)**	ID	Trip (%)**	ID	Trip (%)**
MET 329	0.033 ± 0.00053	NAR 554	0.044 ± 0.00050	SAS 366	0.051 ± 0.00041	BOY 474	0.058 ± 0.00125	NAR 332	0.044 ± 0.00086	HUI 347	0.052 ± 0.00088
MET 315	0.033 ± 0.00119	COR 310	0.044 ± 0.00036	BOY 516	0.051 ± 0.00078	VAL 372	0.058 ± 0.00064	NAR 616	0.047 ± 0.00044	TOL 389	0.053 ± 0.00105
CUN 335	0.035 ± 0.00163	CAL 371	0.045 ± 0.00055	CUN 446	0.051 ± 0.00062	CAL 317	0.058 ± 0.00046	CUN 350	0.049 ± 0.00121	BOY 463	0.053 ± 0.00046
NAR 540	0.037 ± 0.00103	VAL 395	0.045 ± 0.00092	SAS 340	0.052 ± 0.00087	BOY 451	0.059 ± 0.00095	VAL 341	0.049 ± 0.00068	CAU 330	0.055 ± 0.00050
TOL 390	0.043 ± 0.00022	HUI 365	0.045 ± 0.001224	CHO 307	0.054 ± 0.00132	TOL 369	0.059 ± 0.00070	VAL 311	0.050 ± 0.00080	BOY 475	0.056 ± 0.00042
CAU 312	0.043 ± 0.00052	CAQ 307	0.046 ± 0.00064	CAU 436	0.055 ± 0.00062	CAU 368	0.060 ± 0.00057	HUI 349	0.050 ± 0.00093	CUN 554	0.056 ± 0.00067
COR 330	0.043 ± 0.00028	HUI 344	0.048 ± 0.00006	CUN 515	0.056 ± 0.00062	CAU 447	0.060 ± 0.00045	MAG 355	0.050 ± 0.00012	TOL 311	0.059 ± 0.00065
PUT 358	0.043 ± 0.00055	MAG 418	0.050 ± 0.00137	SAN 304	0.056 ± 0.00052	HUI 327	0.061 ± 0.00063	CUN 316	0.050 ± 0.00230	TOL 345	0.059 ± 0.00039
BOY 466	0.044 ± 0.00064	BOY 489	0.050 ± 0.00081	ANT 497	0.057 ± 0.00083	ANT 493	0.062 ± 0.00073	CAL 372	0.051 ± 0.00062	ANT 539	0.061 ± 0.00045
HUI 358	0.044 ± 0.00035	SAS 327	0.050 ± 0.00059	PUT 340	0.058 ± 0.00097	NAR 379	0.083 ± 0.00089	BOY 439	0.052 ± 0.00026	ANT 494	0.062 ± 0.00053

* Muestras provenientes del United States National Plant Germoplasm System en el NCRPIS (North Central Regional Plant Introduction Station).

** Promedio de 4 réplicas, ± desviación estándar.

IDEN Muestras que fueron eliminadas por H y/o T.

Como se muestra en la Tabla 1, las muestras de calibración presentaron un rango en el contenido de triptófano de 0,033 % a 0,083 %, un valor medio de 0,051 % y una desviación estándar de 0,0095. Las muestras de validación presentaron valores entre 0,044% y 0,062% con un valor medio de 0,053 % y una desviación estándar de 0,0048.

Estadística de la calibración NIRS. En el proceso de validación cruzada tomando como criterio los valores de H y T, se eliminaron siete muestras quedando un total de 33 muestras de calibración. Los parámetros obtenidos de la ecuación de calibración se muestran en la Tabla 2.

En la Tabla 2 se observa que el error estándar de calibración y el error de validación cruzada es muy bajo no mayor a 0,005. El aminoácido triptófano puede ser estimado con una precisión del 97,8% con una desviación estándar de 0,007% y coeficiente de variación de 0,13%. Reportes anteriores (Fontaine *et al.*, 2001, 2002), muestran un nivel de precisión del 96% con un grupo de 160 de muestras de harina de soya y 115 de harina de pescado. A su vez, para 270 muestras de harina de carne la precisión fue del 98%, 115 muestras de trigo del 84%, 109 muestras de cebada del 92%, 156 muestras de maíz del 82%, 104

muestras de triticale del 91%, 52 muestras de salvado de arroz del 95%, 110 muestras de sorgo del 98%. Ello que indica que el nivel de precisión de la calibración es dependiente, tanto del número de muestras, como de la matriz que se analice.

Validación de NIRS en matrices de maíz. Con las veinte muestras seleccionadas para confirmar la ecuación de calibración, referenciadas así mismo en la Tabla 1, se realizó el proceso de validación del método de NIRS que se resume en la Tabla 3.

Los valores de las medias, mínimos y máximos de los métodos de HPLC y NIRS son similares como se observa en la Tabla 3, presentando un coeficiente de correlación y una pendiente entre 0,15 y 0,25 respectivamente, pero con un error de predicción bajo de 0,008, lo que indica una exactitud alta del método de NIRS.

En la Figura 1, se muestran los resultados de las matrices de maíz usadas para validación, tanto por HPLC como NIRS. Estos resultados fueron sometidos a la Prueba de Hipótesis con Ji Cuadrado (X^2), para aceptar o rechazar la ecuación hallada.

El valor de Ji-cuadrado para maíz fue 0,023, procesado con 19 grados libertad (n-1 muestras), con un nivel de confianza del 95%. De acuerdo a estos resultados, los valores observados experimentalmente se ajustan a los teóricos esperados; por lo tanto, hay concordancia en el contenido de triptófano en matrices de maíz con un nivel de significancia de 5% (Steel y Torrie, 1985).

Sin embargo, es importante anotar que para todos los análisis realizados por NIRS, la exactitud de estas predicciones dependerá totalmente de la precisión del método directo que se use; por ello,

Tabla 2. Estadística de la calibración NIRS de maíz^a.

Variable	Contenido (%) de la variable en la población de muestras				Ejecución de los datos NIRS			
					Calibración		Validación cruzada	
	media	C.V.	min.	máx.	SEC ^b	RSQ	SECV ^{**}	1-VR ^{***}
Triptófano	0,052	0,135	0,04	0,06	0,001	0,9789	0,005	0,446

^a Número de muestras, n = 33 muestras.

* SEC: Error Estándar de Calibración.

** SECV: Error estándar de Validación Cruzada.

*** 1-VR: Coeficiente de determinación en la validación cruzada.

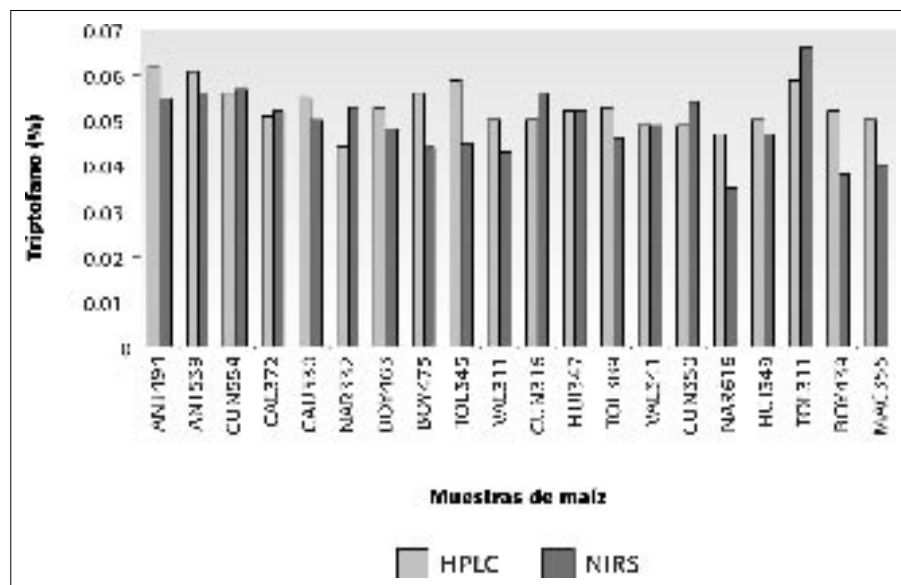
Tabla 3. Estadística de la validación NIRS de maíz^a.

Variable	Triptófano (%) HPLC			Triptófano (%) NIRS			Datos de validación NIRS		
	media	min.	máx.	media	min.	máx.	SEP*	RSQ _{val}	SLOPE**
Triptófano	0,053	0,044	0,062	0,049	0,035	0,066	0,008	0,152	0,251

^a Número de muestras, n = 20 muestras.

* SEP: Error Estándar de Predicción.

RSQ_{val}: Coeficiente de correlación de muestras independientes de validación. ** SLOPE: Pendiente.

**Figura 1.** Comparación del contenido de triptófano en maíces colombianos por HPLC y NIRS.

los análisis no deberán tener más de 5% de coeficiente de variación. Además, una buena calibración y validación dependerán de la composición, naturaleza de las muestras seleccionadas y del número de muestras usadas para el proceso; en este caso el número de muestras fue limitante lo que implicó una correlación baja (0,152) para el método de NIRS; esta correlación se mejoraría incluyendo más muestras en el proceso de calibración.

Conclusiones

El modelo de calibración por NIRS fue exitosamente desarrollado para el aminoácido triptófano con una precisión del 98%. Sin embargo el R² obtenido de la validación de la ecuación de triptófano por el software WINISI es bajo, debido a la poca variabilidad natural del material experimental y el limitante del número de muestras. Por ello se aplicó la prueba del Ji Cuadrado comparando los valores observados (NIRS) con los valores teóricos esperados (por HPLC), los cuales no presentaron diferencia significativa entre ellos, aceptando dicha ecuación de calibración a un nivel confianza del 95%. Sin embargo, es necesario agregar nuevas muestras de Maíz con otros contenidos de este aminoácido para mejorar

la calibración y validación del método en un futuro cercano.

AGRADECIMIENTOS

Diana Rocío Vásquez agradece a CORPOICA y COLCIENCIAS a través del Programa de Jóvenes Investigadores por el financiamiento. Al Dr. Paul Scott de la Universidad Estatal de Iowa por suministrar los materiales de maíz. Las autoras agradecen a los Drs. Alejandro Alberto Navas y Rolando Barahona por la orientación y apoyo en la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

American Association of Cereal Chemists. 1984. Method 07-25.

Association of Official Agricultural Chemists (AOAC). 1995. Official methods of analyses No. 920.39. AOAC- International Suite. 400.2200 Wilson Boulevard. Arlington Virginia. 22201-3301 USA.

Delwiche, S.R.; Bean, M.M. and Miller, R.E. 1995. Apparent amylose content of milled rice by near infrared reflectance spectrometry. *Cereal Chem.* 72: 182-187.

Delwiche, S.R.; McKenzie, K.S. and Webb, B.D. 1996. Quality characteristics in rice by near infrared reflectance analysis of

whole grain milled samples. *Cereal Chem.* 73: 257-263.

Fontaine, J.; Horr, J. and Schirmer, B. 2001. Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) enables the fast and accurate prediction of the essential amino acid contents. 1. Results in soy, rapeseed meal, sunflower meal, peas, fishmeal, meat meal products, and poultry meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 57-66.

Fontaine, J.; Horr, J. and Schirmer, B. 2002. Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) enables the fast and accurate prediction of essential amino acid contents. 2. Results for wheat, barley, corn, triticale, wheat bran/middlings, rice bran, and sorghum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3902-3911.

Fontaine, J.; Horr, J. and Schirmer, B. 2004. Amino acid contents in raw materials can be precisely analyzed in a global network of Near-Infrared Spectrometers: Collaborative trials prove the positive effects of instrument standardization and repeatability files. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 701-708.

Garrido, A; Gomez, A. et al. 1996. NIRS: Una tecnología de apoyo para un servicio integral en alimentación animal. En: XII Curso de Especialización FEDNA. Madrid.

Mayorga, O.L. y Vásquez, D. 2004. Comparación y validación de las técnicas de HPLC y microorganismos auxótrofos en la determinación de triptófano en razas de maíz colombiano. Memorias de la XX Reunión Latinoamericana de Maíz. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo CIMMYT y el INIA. Universidad de la Molina, Lima, Perú, 11 al 15 de octubre de 2004.

Steel, R.G. y Torrie, J.H. 1985. *Bioestadística: principios y procedimientos*. 2ª edición. Mac Graw-Hill. Latinoamericana, Bogotá, Colombia. pp. 458-468.

Shu, Q.Y.; Wu, D.X.; Xia, Y.W.; Gao, M.W. and McClung, A. 1999a. Analysis of grain quality characters in small ground brown rice samples by near infrared reflectance spectroscopy. *Sci. Agric. Sinica.* 32 (4): 92-97.

Shu, Q.Y.; Wu, D.X.; Xia, Y.W.; Gao, M.W. and McClung, A. 1999b. Calibration optimization for rice apparent amylose content by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *J. Zhejiang Univ. (Agric. Life Sci.)* 25 (4): 343-346.

Van Kemp, T. and Bodin, J.C. 1998. Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) appears to be superior to nitrogen-based regression as a rapid tool in predicting the poultry digestible amino acid content of commonly used foodstuffs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 76: 139-147.

Wu, J.; Shi, C. and Zhang, X. 2002. Estimating the amino acid composition in milled rice by Near - Infrared Reflectance Spectroscopy. *Field Crops Research* 75: 1-7.